

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON TIOSULFINATO SOBRE LAS POBLACIONES MICROBIANAS Y EL PERFIL DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN EL RUMEN DE CAPRINO

Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Ramos-Morales E., Martín-García A.I., Molina-Alcaide E. y Yáñez-Ruiz, D. R.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008, Granada.

gonzalo.martinez@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años diferentes estudios han demostrado que la adición de distintos compuestos activos de plantas y diferentes dietas pueden modificar la diversidad de las poblaciones de arqueas metanogénicas (Zhou et al., 2010) sin afectar a la concentración de arqueas del rumen (Ohene-Adjei et al., 2008). Sin embargo, estudios recientes obtenidos *in vivo*, respecto a las arqueas metanogénicas, con diversos compuestos y componentes de la dieta con efecto antimetanogénico aún arrojan resultados variables y contradictorios (Patra y Yu, 2012; Romero-Huelva, 2012). Así mismo, la concentración de otros grupos microbianos, como los protozoos, se ha visto afectada por estos compuestos en algunos estudios (Kongmun et al., 2011; Patra y Yu, 2012) mientras que en otros no ocurre (Abecia et al., 2012). Parte de esa variabilidad puede estar relacionada con la naturaleza de los agentes utilizados, aunque también con el tiempo de tratamiento. Estudios recientes de pirosecuenciación, llevados a cabo por nuestro grupo, reflejan que la adición durante 12 días del aditivo propil propano tiosulfato (PTS) en fermentadores de flujo continuo, originó un cambio en la diversidad de arqueas (Martínez et al., 2012). Por ello, este trabajo se planteó con el objetivo de estudiar el efecto de la adición de PTS sobre las poblaciones microbianas y la diversidad de arqueas metanogénicas en el rumen de caprino tras 14 y 28 días de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 cabras adultas, canuladas en rumen, de raza murciano-granadina, distribuidas en 2 grupos en función de su peso vivo ($37,6 \pm 5,81$ kg). Los animales se alimentaron a nivel mantenimiento energético (Prieto et al., 1990) con una dieta basada en heno de alfalfa y concentrado en relación 1:1 (Ingredientes concentrado: Harinilla de trigo 35%, cebada 21%, torta de girasol 15%, harinilla de maíz 9%, sorgo 8%, harina de soja 5%, cáscara de soja 4% y 3% de corrector vitamínico), durante un periodo de adaptación de 12 días. Durante los siguientes 30 días los animales recibieron la misma dieta, tratándose a 5 de ellos con PTS y a los 5 restantes sin administración del aditivo (control). El PTS (pureza del 9% fijado en alfa-ciclodextrina) se administró de manera creciente durante 5 días para facilitar la adaptación de los animales al aditivo hasta alcanzar la dosis experimental (0,2 g/kg peso vivo), que se repartió en 2 tomas diarias. En cada toma el PTS se pesaba en papel de celulosa junto con un 1 g de cebada molida a 1 mm y se introducía en el rumen a través de la cánula. A los animales del grupo control también se le introdujo, a través de la cánula, 1 g de cebada molida a 1 mm en papel de celulosa en los mismos momentos y de la misma manera que se procedía con el PTS. Los animales se alimentaron dos veces al día y la ingestión de alimento se controló diaria e individualmente. Los días 14 y 28 se tomaron alícuotas de 10 mL del contenido ruminal de los animales, antes de la primera toma del alimento, congelándose a -80°C y liofilizándose posteriormente. A partir de las muestras liofilizadas (0.05 g) se realizó la extracción de ADN total utilizando el kit QIAmp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). El ADN se empleó para la cuantificación absoluta de bacterias totales, protozoos y arqueas metanogénicas mediante PCR a tiempo real, siguiendo la metodología descrita por Abecia et al. (2012a). El número de copias génicas se expresó por unidad de muestra fresca de la que procedía el extracto de ADN. La estructura de la comunidad de arqueas metanogénicas se estudió mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE). Para ello, el ADN extraído anteriormente se amplificó por PCR usando los cebadores del gen *mcrA*, específico para la comunidad de arqueas (Abecia et al., 2012b). La imagen se analizó usando el programa Quantity One, construyéndose el dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA a partir del coeficiente Dice. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de la varianza de una sola vía por medio del programa SPSS 19.0[®]. Las diferencias ($P < 0,05$) entre medias se establecieron utilizando el test DMS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de copias de bacterias totales, arqueas metanogénicas y protozoos presentes en el rumen de las cabras (tabla 1), no mostró diferencias ($P \geq 0,149$) debidas al tratamiento ni el día 14 de muestreo ni el 28. La similitud de la comunidad de arqueas metanogénicas en las cabras los días 14 y 28 tras el inicio del tratamiento se muestra en la Figura 1. El dendograma muestra que las arqueas correspondientes al contenido ruminal, tomado el día 28, de animales tratados con PTS se agruparon mayoritariamente separadas con respecto al resto de las muestras estudiadas (4 animales de 5). Por el contrario, los animales tratados con PTS el día 14 no se diferenciaron de los animales control, apuntando a una posible diferenciación entre los días 14 y 28. Los niveles de similitud de la comunidad de arqueas de los animales tratados con PTS a los 28 días del inicio del tratamiento y agrupados en el mismo *cluster* fueron superiores al 60%. El índice Shannon de biodiversidad no se vio modificado por el tratamiento con PTS en ninguno de los días. Los resultados observados en cuanto a la concentración de bacterias totales, arqueas y protozoos en este trabajo concuerdan con los observados por Abecia et al. (2012a) utilizando como compuesto antimetanogénico bromoclorometano que no afectó a la biomasa de las poblaciones microbianas del rumen de cabras adultas en lactación, en las que se observó un descenso de la producción de metano. Por otra parte Romero-Huelva (2012), en cabras alimentadas con dietas que redujeron la producción de metano tampoco observó modificaciones en la densidad de bacterias totales, ni en animales en mantenimiento ni en lactación, aunque la densidad de las arqueas metanogénicas aumentó en animales en mantenimiento y no se modificó en cabras en lactación. Otros autores (Kongmun et al., 2011) no observaron efectos significativos en búfalos tratados con derivados del ajo sobre las poblaciones de arqueas ni las bacterias totales en el rumen cuando se redujo la producción de metano, mientras que el número de protozoos sí se vio afectado. Respecto a la similitud en las comunidades de arqueas, observada el día 28 en animales tratados con PTS, nuestros resultados concuerdan con la evidencia de un aumento de la diversidad en las poblaciones de arqueas metanogénicas en ovejas tratadas con aceite de ajo y otros aceites esenciales observada por Ohene-Adjei et al. (2008). En este sentido, Zhou et al. (2010) han demostrado que animales con una menor producción de metano poseían una comunidad de arqueas en el rumen diferente, en comparación con los que producían más metano, independientemente de la biomasa total de arqueas en el rumen. Por último cabe destacar que el estudio, mediante pirosecuenciación (Martínez et al., 2012), de las muestras procedentes de fermentadores inoculados con líquido ruminal de caprino y tratados con PTS durante 12 días, originó una reducción de arqueas del orden *Methanomicrobiales* asociada a un descenso de la producción de metano. En conclusión, los resultados de este trabajo concuerdan con otros estudios acerca del efecto de compuestos derivados del ajo sobre la distribución de grupos de arqueas en el ecosistema ruminal, aunque la biomasa total de arqueas, bacterias y protozoos en el rumen no se vea afectada. Además, los cambios inducidos en el grupo de arqueas solo se manifiestan tras un tiempo relativamente prolongado de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia L., Toral P., Martín-García A., Martínez G., Tomkins N., Molina-Alcaide E., Newbold C. & Yáñez-Ruiz D. 2012a. *J. Dairy Sci.* 95:2027-2036. ● Abecia L., Rodríguez-Romero N., Yáñez-Ruiz D.R. & Fondevila M. 2012b. *Anaerobe.* 18:344-349. ● Kongmun P., Wanapat M., Pakdee P., Navanukraw C. & Yu Z. 2011. *Livest. Sci.* 135:84-92. ● Martínez G., Abecia L., Snelling T., Martín-García A.I., Ramos E., Molina-Alcaide E., Newbold C.J. & Yáñez-Ruiz D.R. 2012. *Proceedings in: 8th INRA-ROWETT Symposium on Gut Microbiol.* 147. ● Romero-Huelva M. 2012. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. ● Ohene-Adjei S., Chaves A., McAllister T., Benchaar C., Teather R. & Forster R. 2008. *Microbial Ecol.* 56:234-242. ● Patra A.K. & Yu Z. 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4271-4280. ● Prieto C., Aguilera J., Lara L. & Fonollá J. 1990. *Br. J. Nutr.* 63:155-163. ● Zhou M., Hernandez-Sanabria E. & Guan L.L. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6524-6533.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2008-04707-C02-01). G. Martínez agradece la ayuda técnica a E. Jiménez, T. García, F. Ramos y P. Rufino.

EFFECTS OF THE ADDITION OF THYOSULFINATE ON RUMEN MICROBIAL POPULATIONS AND ARCHAEAL DIVERSITY IN GOATS

ABSTRACT: Ten non-lactating goats were used to test the effect of propyl propane thiosulfinate (PTS) on microbial population biomass and archaeal diversity after 14 and 28 days of treatment. All goats received a diet based on alfalfa hay and a concentrate (F:C 1:1) and were divided in two groups. Treated animals received increasing doses of PTS during the first 5 days and then 0.2 g/kg BW per day of PTS. Total bacteria, protozoa and methanogenic archaea were quantified by using qPCR. Archaeal biodiversity was determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Neither total bacteria, protozoa and Archaea concentration were affected by the PTS treatment ($P \geq 0.149$) on days 14 and 28 of the trial. However, on day 28 archaeal community structure in animals treated with PTS was different as compared with control.

Keywords: propyl propane thiosulfinate, microbial population, rumen, goats.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con PTS durante 14 y 28 días sobre la concentración (\log_{10} copias del gen/g materia fresca) de bacterias totales (ARNr16S), protozoos (ARNr18S) y arqueas metanogénicas (mcrA) en el rumen de cabras.

Log ₁₀ copias del gen/g MF		Control	PTS	EEM	P-valor
Bacterias totales	Día 14	9.84	9.85	0.067	0.977
	Día 28	9.91	9.93	0.045	0.843
Protozoos	Día 14	8.16	8.26	0.068	0.489
	Día 28	8.35	8.45	0.052	0.372
Metanogénicas	Día 14	8.51	8.57	0.092	0.751
	Día 28	8.84	8.64	0.066	0.149

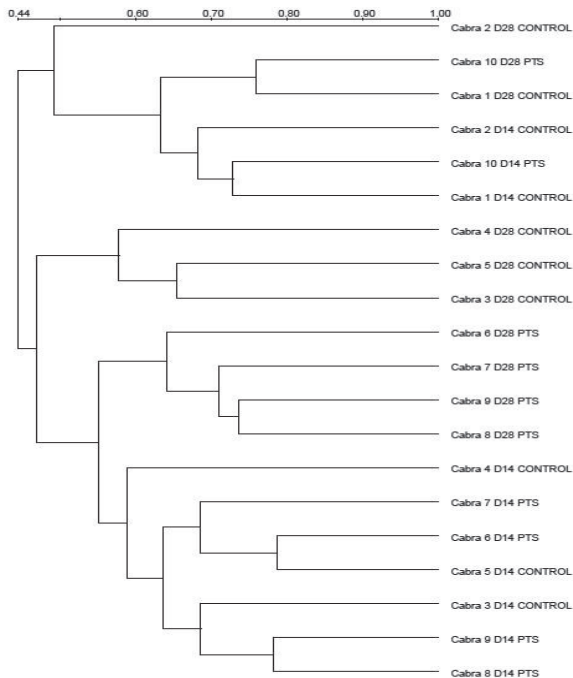


Figura 1. Dendrograma derivado del análisis de DGGE de la similitud en la población de arqueas del rumen de cabras tratadas durante 14 y 28 días con propil propano tiosulfinato (PTS) y no tratadas (control).